

APLICACIONES PAC Y PAS EN BIOLOGÍA Y ONCOLOGÍA

C.Y.CHAIN^{1,2}, M.G. DE BRAVO³, M.R. CEOLÍN⁴ y A.F.PASQUEVICH^{1,2}

1-Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas - UNLP – Argentina, IFLP (CONICET).

2- Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires - Argentina.

3-Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata – Facultad de Ciencias Médicas – UNLP - Argentina

4-Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas – Fac. de Ciencias Exactas – UNLP - Argentina

e-mail:yamil@fisica.unlp.edu.ar

Aunque algunos Métodos Nucleares son frecuentemente aplicados a la Biología, este no es el caso de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC) y de la Espectroscopia de Aniquilación de Positrones (PAS). Esto ocurre a pesar del poder de estas técnicas en la caracterización microscópica de diversos materiales. En la presente comunicación se describen aplicaciones de estas técnicas a problemas concernientes a la biología y oncología. Se analizan los aspectos favorables y desfavorables. Se discuten experimentos PAC a realizar para caracterizar el entorno atómico de isótopos ^{111}In y ^{111}Cd en portadores de radiotrazadores, radiofármacos y proteínas. También se discute la posibilidad de utilizar determinaciones PAS de vidas medias de positrones para distinguir entre distintos estadios de tumores.

Several Nuclear Methods are frequently used in Biology. This is not the case of Perturbed Angular Correlations (PAC) technique and Positron Annihilation Spectroscopy (PAS). This occurs in spite of the power of these techniques in characterizing microscopically diverse materials. In the present communication applications of these techniques to problems concern to biology and oncology are described. The favorable aspects and disadvantages are analyzed. The PAC experiments to characterize the atomic environment of the isotopes ^{111}In and ^{111}Cd in radiotracer carriers, radiopharmaceuticals and proteins, are discussed. It is also discussed the possibility of using Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy to distinguish between different stages of tumors.

I. INTRODUCCIÓN

La ciencia tiene por objeto generar conocimiento y éste es más valioso cuando mejora la vida del hombre. La Física Nuclear estudia la estructura fundamental de la materia y las interacciones entre las partículas subatómicas. Aunque estos fenómenos pasan desapercibidos en la vida cotidiana, hay un conjunto de técnicas y aplicaciones de la Física Nuclear que tienen un gran impacto en la sociedad, tal es el caso del uso de trazadores radiactivos, la caracterización de proteínas y biomoléculas, varias técnicas de imágenes basadas en transiciones o radiaciones nucleares, etc.⁽¹⁾.

Existe una región interdisciplinaria, que limita con la Física Nuclear, la Biología y la Medicina. Esta región es un campo fértil para la colaboración entre biólogos, médicos y físicos, para desarrollar métodos, instrumentos y facilidades que permitan progresar en el conocimiento de los procesos biológicos y finalmente incidir en la mejora de la salud de la población. El presente trabajo está inserto en esta área del conocimiento.

Aun existen técnicas nucleares cuya aplicación a la Biología no ha sido exhaustivamente analizada. Éste es el caso de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC) y de la Espectroscopia de Aniquilación de Positrones (PAS). La presente investigación consiste en un estudio de la posibilidad de aplicación de estas técnicas a problemas concernientes a la biología y oncología.

Es posible anticipar diversas dificultades. La investigación está orientada a la determinación de

alternativas y procedimientos que simplifiquen las aplicaciones.

II. MÉTODOS

Aunque las técnicas PAC y PALS están basadas en procesos físicos muy diferentes, su equipamiento experimental es similar, involucrando detección de radiación gama y espectroscopia temporal. Sin embargo, el equipo PAC se utiliza para medir radiaciones coincidentes a 90° y 180° (usando 4 detectores), mientras que en el equipo PAS se miden las coincidencias a un único ángulo (se usan dos detectores a 180°). En la siguiente figura se esquematiza un espectrómetro PAS (Det 1 y Det 2: detectores, DISC: discriminador, AMP: amplificador, SCA: analizador monocal, COINC: unidad de coincidencias, DELAY: línea de retardo, TAC: convertidor de tiempo en amplitud, MCA: analizador multicanal).

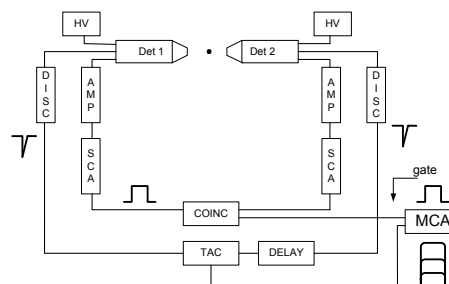


Figura 1: Esquema de un equipo de coincidencias rápidas de medida de vidas medias de positrones

Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC)

Esta técnica permite determinar características de la distribución electrónica y atómica en torno del núcleo de apropiados isótopos radiactivos (núcleos sondas)⁽²⁻⁵⁾. En particular, estos isótopos se desexcitan mediante la emisión de dos radiaciones gama en cascada. La técnica se basa en que existe una correlación angular entre esos rayos gama. Esta correlación angular estará perturbada por el entorno particular de ese átomo radiactivo y al ser medida permite obtener una “huella digital” de la estructura cercana a ese átomo. Experimentalmente se determina la probabilidad de que la segunda radiación sea detectada a ángulos de 90° y 180° respecto de la primera, en función del tiempo transcurrido entre ambas detecciones.

Buenos isótopos PAC son ^{111}Cd y ^{181}Tl . Hay otros, pero no son tan buenos o no son tan accesibles.

Hemos hecho una revisión de los estudios PAC en temas biológicos⁽⁶⁾ y constatado que existen pocas aplicaciones PAC a sistemas biológicos (PASB). Hemos analizado la mayoría de estos trabajos (120 publicaciones). Como se muestra en la Fig.2, el número de publicaciones ha aumentado hasta el comienzo de la década del 90. Actualmente el número de publicaciones promedio por año ha descendido un poco.

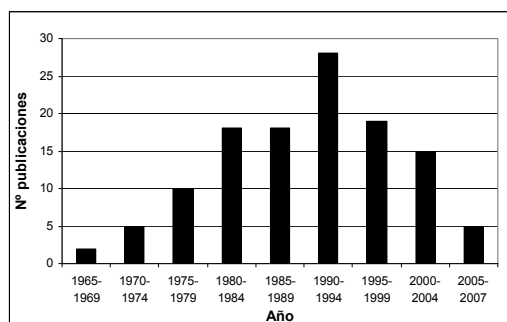


Figura 2: Número de PASB versus quinquenio de publicación

Las sondas más utilizadas son ^{111}mCd (36% de los trabajos) y ^{111}In (32%). ^{111}mCd fue utilizado esencialmente en estudios de metaloproteínas (ya que puede reemplazar al ión nativo). ^{111}In se ha utilizado en el estudio de vesículas lipídicas, proteínas e incluso ADN. ^{181}Hf aparece en el tercer lugar (8%) y en general se ha utilizado en estudios de biodistribución ya que puede ser considerado un análogo del plutonio.

El 88% de las PABS corresponden a sistemas *in vitro* (aquí se incluyen cultivos celulares). Los estudios *in vivo* incluyen ratas, ratones, bacterias y plantas⁽⁶⁾.

Los tópicos investigados con la técnica PAC cubren varios aspectos de la biología y la bioquímica tales como la captación *in vivo* de metales, dinámica de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, cambios conformacionales en proteínas, estructura de sitios metálicos e integridad de liposomas *in vivo*.

Dificultades experimentales de PABS

Las mejores sondas PAC son ^{111}Cd y ^{181}Tl , las cuales no son comunes en sistemas biológicos. Tampoco son comunes sus isótopos padres, ^{111}Ag o ^{111}In (Fig.3) y el ^{181}Hf (Fig. 4).

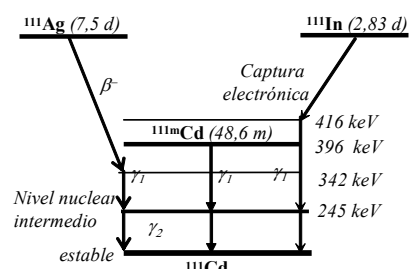


Figura 3: Desintegración de ^{111}Ag , $^{111\text{m}}\text{Cd}$ y ^{111}In

El ^{111}In , con una vida media de 2,8 días, permite realizar experimentos que requieren cierto tiempo para la preparación de la muestra. Aunque tiene muchos usos en el campo de la biología, presenta características que pueden interferir en la medida PAC, según el entorno atómico (“aftereffects” del proceso de captura electrónica). Esto es, los electrones Auger producidos luego de la desintegración dejan al átomo sonda en un estado altamente ionizado. Si este estado continúa después de algunas decenas de picosegundos, cuando se establece la cascada gama, aparece una fuerte perturbación de la medida PAC que no permite ver el entorno del átomo. Este problema no existe en el caso de la cascada siguiendo a la desintegración de ^{111}Ag o la desexcitación del $^{111\text{m}}\text{Cd}$.

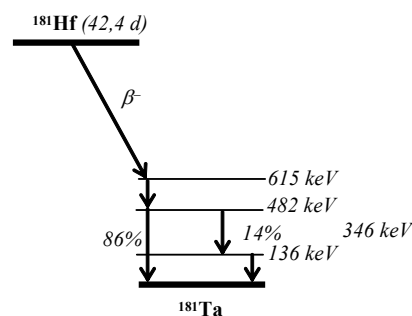


Figura 4: Decaimiento del ^{181}Hf

El isótopo ^{111}mCd puede sustituir elementos tales como el Cu y el Zn que son más comunes en la naturaleza. Sin embargo el ^{111}mCd tiene un semiperíodo corto ($T_{1/2}=48,6$ min) y normalmente el procedimiento de dopaje requiere separación de isótopos. Para la ^{111}Ag , el $T_{1/2}$ es favorable (7,45 días) aunque la cascada PAC es débilmente poblada (5%).

Por último, ^{181}Hf tiene un buen semiperíodo (42,4 días) y la desintegración β , combinada con una larga vida media del nivel inicial de la cascada gama no produce “after-effects”. Desafortunadamente, este isótopo no tiene aplicaciones importantes en el campo de la biología

Usos biológicos de las sondas PAC más populares

El ^{111}In es un isótopo muy popular en el campo de la medicina ya que forma parte de gran cantidad de radiofármacos. Se utiliza como trazador en medicina cardiovascular ⁽⁷⁾, para tratamiento del cáncer ⁽⁸⁾, y como análogo del emisor beta ^{90}Y en la caracterización de radiofármacos terapéuticos ⁽⁹⁻¹⁰⁾. La técnica PAC podría aportar información original en estos casos, caracterizando el entorno atómico del átomo sonda y permitiendo determinar cambios de dicha configuración en los procesos biológicos

Experimentos PAC en realización

Incluimos en este trabajo una propuesta de investigación que consiste en los estudios enunciados más abajo, utilizando como isótopo sonda el ^{111}Cd , tanto producido por activación neutrónica del ^{110}Cd o como producto de la desintegración, por captura electrónica, del ^{111}In . Ambas formas de producción tienen sus inconvenientes, así que habrá que elegir la más adecuada para cada tipo de muestra.

El método más simple para el dopaje de las muestras es el que utiliza ^{111}In (^{111}In (EC) ^{111}Cd). El ^{111}In se obtiene comercialmente como InCl_3 (cloruro de indio). El método de activación neutrónica consiste en producir el isótopo ^{111}Cd por la reacción nuclear $^{110}\text{Cd}(n,\gamma)^{111}\text{Cd}$ utilizando Cd enriquecido en ^{110}Cd y luego separando el ^{111}Cd con un separador de masas, implantándolo sobre hielo. El paso siguiente es utilizar el agua con la radiactividad para dopar las muestras de interés. Estos experimentos se llevarán a cabo en Suiza, mediante una cooperación con el CERN (Organización Europea para la Investigación Nuclear) o en Brasil, en el Instituto de Pesquisas Energéticas y Nucleares de San Pablo. En nuestro Laboratorio, estamos tratando de desarrollar un procedimiento eficiente y rápido, para el dopaje con Cd del material de interés.

Los materiales biológicos que se comenzarán a investigar son radiofármacos marcados con ^{111}In . Empezaremos con compuestos sintetizados en nuestro laboratorio y luego estudiaremos dos radiofármacos comerciales: el ^{111}In -DTPA-EGF⁽⁸⁾ y el anticuerpo monoclonal ^{111}In -DTPA-HMGF (DTPA: dietiléntriamino pentaacetato, EGF: Factor de Crecimiento Epidermal, HMGF: glóbulo lipídico de leche humana).

Respecto al estudio de metaloproteínas, nos interesan en particular las metaloproteinasas (MMP), proteínas clave en el desarrollo de las metástasis. Las MMP contienen un átomo de zinc en su estructura, necesario para su función como enzima y fácilmente reemplazable por Cd. Existe mucho interés en los mecanismos de inhibición de dichas proteínas ⁽¹¹⁾ como herramienta terapéutica para el cáncer. Nos proponemos contribuir con la información que PAC pueda aportar, caracterizando a escala nanométrica la estructura proteica con y sin inhibidores. Ensayaremos el dopaje de las metaloproteinasas con ^{111}Cd y con ^{111}In . Estudios

previos en proteínas en las que el Zn nativo se ha reemplazado por Cd demuestran que las proteínas sustituidas conservan su actividad catalítica ⁽¹²⁾.

Espectroscopía de Aniquilación de Positrones (PAS)

El positrón es la antipartícula del electrón. Cuando un positrón encuentra un electrón, se aniquila produciendo rayos gama. La técnica PAS puede incluir la determinación de la vida media del positrón, el análisis de la forma de línea de la radiación de aniquilación o la correlación angular de los fotones de aniquilación.

Cuando se implantan positrones en un medio, se frenan hasta poseer la energía cinética de los electrones del medio (termalización). Después de alcanzar el equilibrio térmico, el positrón se aniquila con un electrón produciendo dos rayos gama de 511 keV. El tiempo de vida de los positrones es característico de cada material y ronda los 10^{-10} segundos. La Tabla 1 muestra las características de los emisores de positrones más comunes.

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LOS EMISORES DE POSITRONES MÁS COMUNES

| Radioisótopo | Fracción de positrones (%) | Vida media | $E_{\text{máx}}(e^+)$ (MeV) | GC. (MeV) |
|------------------|----------------------------|------------|-----------------------------|-----------|
| ^{11}C | 99 | 20 m | 0,97 | - |
| ^{18}F | | 110 m | 0,64 | |
| ^{22}Na | 90 | 2,7 a | 0,54 | 1,28 |
| ^{44}Ti | 88 | 47 a | 1,47 | 1,16 |
| ^{68}Ga | 88 | 275 d | 0,98 | - |
| ^{57}Ni | 46 | 36 h | 0,4 | 1,4 |
| ^{64}Cu | 19 | 12,8 h | 0,66 | - |
| ^{58}Co | 15 | 71 d | 0,48 | 0,81 |

El isótopo más utilizado es el ^{22}Na , cuyo esquema de desintegración se muestra en la siguiente figura

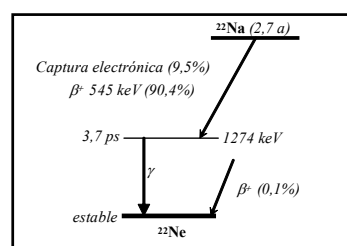


Figura 5: Representación esquemática de la desintegración del ^{22}Na

Una característica importante de esta desintegración es que presenta emisión gama en coincidencia (GC) con la aparición del positrón, lo que permite realizar medidas de vida media de este último.

Estudiando la vida media de los positrones se puede determinar el tamaño, cantidad y distribución de volúmenes libres de los materiales. En los

sistemas que nos interesan, materiales poliméricos y biológicos, se forma positronio Ps con alto rendimiento.

El positronio es un análogo del átomo de hidrógeno, donde el e^+ está unido a un electrón del medio. El Ps puede existir en estado singlete (parapositronio, pPs) o triplete (ortopositronio, oPs). El ortopositronio es la especie preponderante. Los tiempos de aniquilación pueden ser ordenados de acuerdo al estado desde el cual el positrón se aniquila, como se ilustra en la Tabla 2.

TABLA 2: ESCALAS DE TIEMPO CARACTERÍSTICAS DE VARIOS PROCESOS DE ANIQUILACIÓN DE POSITRONES EN LA MATERIA

| Estado del positrón | Tipo de proceso | Vida media |
|---------------------|------------------------------|------------|
| e^+ "libre" | 2γ | 0,1-0,4 ns |
| e^+ "atrapado" | 2γ | 0,2-0,5 ns |
| pPs | 2γ (autoaniquilación) | 0,1 ns |
| | 2γ (proceso pick-off) | >1 ns |
| oPs | 3γ (autoaniquilación) | 140 ns |
| | 2γ (proceso pick-off) | >1 ns |

Aplicaciones de la técnica PAS

La técnica PAS ha sido utilizada históricamente para estudiar defectos en sólidos (metales, aleaciones y semiconductores). En los últimos 20 años, su uso se ha extendido al campo de los materiales poliméricos. En el campo de la biología hay muy pocos estudios, entre los que se destacan la utilización de la técnica para diferenciar tejidos cancerosos de los tejidos normales ⁽¹³⁾ y para monitorear el crecimiento tumoral ⁽¹⁴⁾

Experimentos PAS a realizar

Los experimentos PAS a realizar consisten en la medición de vidas medias de positrones en distintas muestras biológicas a las que se les adosará una fuente de ^{22}Na , encerrada en kapton delgado

Comenzaremos los estudios PAS con sistemas químicos muy sencillos antes de pasar al estudio de tejidos tumorales. En este sentido, disponemos de varios tipos de polímeros de síntesis como alginato, pectinas de alto y bajo grado de metoxilación, goma arábica, carragenatos y emulsanos. Estudiaremos el volumen libre de los distintos polímeros en función del método de preparación.

Luego nos centraremos en el estudio de películas de colágeno, como una primera aproximación al estudio de cultivos celulares y cortes tumorales, para optimizar la preparación de muestras y mejorar la obtención y tratamiento de datos.

Referencias

- 1 - Bauer R., Quarterly Rev. of Biophysics, **18**, 1 (1985).
- 2 - Butz T., Hyperfine Interact, **84**, 47 (1994).
- 3 - Hemmingsen L., Sas K. N., y Danielsen E., Chem. Rev., **104**, 4027 (2004).
- 4 - Bode P., Anal. Bioanal. Chem. 379, 181-187 (2004).
- 5 - Bauer R., Limkilde P., y Johansen J. T., Biochem. 15, 334-342 (1976)
- 6 - Chain C.Y., Ceolin M. y Pasquevich A. F. (Hyperfine Interactions, en prensa)
- 7 - Dewanjee M. K. Semin. Nucl. Med. 14, 154-187 (1984)
- 8 - Reilly R. M., Chen P., Wang J., Scollard D., Cameron R., Vallis K. A., J Nucl Med. **47**, 1023 (2006).
- 9 - Virgolini I., Traub T., Novotny C., Leimer M., Föger B., Li S. R., Patri P., Pangerl T., Angelberger P., Raderer M., Burggasser G., Andreae F., Kurtaran A. y Dudczak R., Curr. Pharm. Des. 8, 1781-1807 (2002)
- 10 - Cheson B. D., BioDrugs. 19, 309-322 (2005)
- 11 - Overall C. M. y Kleinfeld O., Nature Cancer Reviews **6**, 227 (2006).
- 12 - Bertini I., Luchinat C. Bioinorganic Chemistry; University Science Books; Mill Valley, 1994; Cap. 2, p. 37
- 13 - Jean Y.C, Li Y., Liu G., Chen H., Zhang J. y Gadzia J. E., Applied Surface Science **252**, 3166 (2006)
- 14 - Elías M. M., Al-Shiehani Z. T. y Al-Mashhadani A.H., Int. J. Sci. Res. **15** X-Y (2005)